

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2003-40792
(P2003-40792A)

(43) 公開日 平成15年2月13日 (2003.2.13)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード*(参考)
A 6 1 K 35/78		A 6 1 K 35/78	W 4 B 0 1 8
A 2 3 L 1/30		A 2 3 L 1/30	B 4 C 0 8 6
	1/302	1/302	4 C 0 8 8
A 6 1 K 31/122		A 6 1 K 31/122	4 C 2 0 6
	31/216	31/216	

審査請求 未請求 請求項の数24 O L (全 10 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-222132(P2001-222132)

(22) 出願日 平成13年7月23日 (2001.7.23)

特許法第30条第1項適用申請有り 2001年3月10日 インターナショナル インスティテュート オブ アンティキアンサー リサーチ頒布の「アンティキアンサーリサーチ 第21巻 第2A号」に発表

(71) 出願人 501236973

ウエストパーク株式会社
東京都練馬区氷川台4丁目47番17号

(72) 発明者 坂上 宏

東京都新宿区中井2-6-1

(72) 発明者 落合 邦康

千葉県我孫子市船戸1-1-16

(72) 発明者 佐藤 和恵

東京都国立市富士見台1-19-21

(74) 代理人 100080791

弁理士 高島 一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 リグニンの新規用途

(57) 【要約】

【解決手段】 リグニンFと、ビタミンK₂、ビタミンK₃、EGCG、CGA、GA又は茶葉の水抽出物とを有効成分とする抗癌剤。リグニンF及びEGCGを有効成分とする抗微生物用医薬組成物、抗微生物/微生物除去剤、家畜・家禽用微生物除去剤。リグニンFと、ビタミンK₂、ビタミンK₃、EGCG、CGA、GA又は茶葉の水抽出物とを成分として含有する健康食品。

【効果】 本発明のリグニンFは、ビタミンK₂、ビタミンK₃、EGCG、CGA、GA又は茶葉の水抽出物との併用により優れた腫瘍選択的細胞障害活性を発揮するので、癌治療において有用。また、EGCGとの併用により抗微生物活性を発揮するので、微生物感染症の予防治療等に有用。さらに、摂取量の安全域が高いことから、健康食品の成分としても有用。

(2) 開2003-40792 (P2003-40792A)

【特許請求の範囲】

【請求項1】 マツ科植物の球果又は種子殻のアルカリ抽出物中のリグニン成分、並びにビタミンK₂、ビタミンK₃、エピガロカテキンガレート、クロロゲン酸及び没食子酸からなる群より選択される物質を有効成分とする抗癌剤。

【請求項2】 マツ科植物の球果又は種子殻のアルカリ抽出物中のリグニン成分、及びビタミンK₃又はクロロゲン酸を有効成分とする抗癌剤。

【請求項3】 マツ科植物がマツ属に属する植物である請求項1又は2記載の抗癌剤。

【請求項4】 癌が口腔癌である請求項1～3のいずれかに記載の抗癌剤。

【請求項5】 マツ科植物の球果又は種子殻のアルカリ抽出物中のリグニン成分及び茶葉の水抽出物を有効成分とする抗癌剤。

【請求項6】 茶葉が発酵茶又は半発酵茶である請求項5記載の抗癌剤。

【請求項7】 マツ科植物がマツ属に属する植物である請求項5又は6記載の抗癌剤。

【請求項8】 癌が口腔癌である請求項5～7のいずれかに記載の抗癌剤。

【請求項9】 マツ科植物の球果又は種子殻のアルカリ抽出物中のリグニン成分及びエピガロカテキンガレートを有効成分とする抗微生物用医薬組成物。

【請求項10】 マツ科植物がマツ属に属する植物である請求項9記載の抗微生物用医薬組成物。

【請求項11】 マツ科植物の球果又は種子殻のアルカリ抽出物中のリグニン成分及びエピガロカテキンガレートを有効成分とする抗微生物もしくは微生物除去剤。

【請求項12】 マツ科植物がマツ属に属する植物である請求項11記載の抗微生物もしくは微生物除去剤。

【請求項13】 マツ科植物の球果又は種子殻のアルカリ抽出物中のリグニン成分及びエピガロカテキンガレートを、微生物感染症の予防又は治療に有効な量、非ヒト動物に投与することを特徴とする、当該動物における微生物感染症の予防又は治療方法。

【請求項14】 マツ科植物がマツ属に属する植物である請求項13記載の方法。

【請求項15】 ヒトの病原性微生物を保有する又は保有するおそれのある家畜もしくは家禽に、マツ科植物の球果又は種子殻のアルカリ抽出物中のリグニン成分及びエピガロカテキンガレートを、当該病原性微生物の除去又は感染防御に有効な量投与することを特徴とする、当該家畜もしくは家禽におけるヒトの病原性微生物の除去又は感染防御方法。

【請求項16】 マツ科植物がマツ属に属する植物である請求項15記載の方法。

【請求項17】 微生物に汚染された又は汚染されるおそれのある物体に、マツ科植物の球果又は種子殻のアル

カリ抽出物中のリグニン成分及びエピガロカテキンガレートを、少なくとも当該微生物の増殖を実質的に抑制するのに有効な量接触させることを特徴とする、当該物体における微生物の除去又は汚染防止方法。

【請求項18】 マツ科植物がマツ属に属する植物である請求項17記載の方法。

【請求項19】 マツ科植物の球果又は種子殻のアルカリ抽出物中のリグニン成分、並びにビタミンK₂、ビタミンK₃、エピガロカテキンガレート、クロロゲン酸及び没食子酸からなる群より選択される物質を成分として含有する健康食品。

【請求項20】 マツ科植物の球果又は種子殻のアルカリ抽出物中のリグニン成分、及びビタミンK₃又はクロロゲン酸を成分として含有する健康食品。

【請求項21】 マツ科植物の球果又は種子殻のアルカリ抽出物中のリグニン成分及び茶葉の水抽出物を成分として含有する健康食品。

【請求項22】 マツ科植物の球果又は種子殻のアルカリ抽出物中のリグニン成分及びエピガロカテキンガレートを成分として含有する健康食品。

【請求項23】 チューイングガムである請求項22の健康食品。

【請求項24】 マツ科植物がマツ属に属する植物である請求項19～23のいずれかに記載の健康食品。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明はリグニンの新規用途に関する。詳細には、本発明は、各種細胞障害活性物質又は抗微生物活性物質との併用による、松かさ又は松の実の殻由来リグニンの当該細胞障害活性又は抗微生物活性の増強作用に基づく、医薬分野、家畜等の衛生管理、環境衛生、及び食品分野への当該リグニンの応用に関する。

【0002】

【従来の技術】リグニンは、自然界に存在する主要なポリフェノールの一つであり、多糖が結合したフェニルプロペノイドポリマーの不定形の構造をとる (Methods Enzymol., 161: 87-101, 1988)。リグニンは、抗腫瘍活性、抗菌活性、抗ウイルス (エイズウイルス、インフルエンザウイルス、ヘルペスウイルス) 活性 (直接的にウイルスの細胞への付着を阻止することによる) 等の多彩な生物活性を示す (In Vivo, 13: 155-171, 1999)。リグニンは、単球や多形核白血球等の食食細胞のヨード化 (放射性ヨードの酸不溶性画分への取り込み) を促進したが、これは、ミエロペルオキシダーゼ・ハロゲン・過酸化水素抗菌システムの活性化を示唆する。リグニンは、マクロファージや単球による腫瘍壊死因子 (TNF) やインターロイキン-1 (IL-1) の産生を促進するが、その機構は不明である (Int. J. Oncol., 1: 283-287, 1992)。

(3) 開2003-40792 (P2003-40792A)

【0003】糖を含まない合成リグニン（フェニルプロペノイドの脱水素重合体）は、抗菌活性と免疫増強活性が低いことから、宿主を介する防御システムにおける多糖の役割が示唆される（*Anticancer Res.*, 11: 881-888, 1991）。

【0004】最近、本発明者らは、単独では細胞障害活性を与えない濃度のリグニンが、アスコルビン酸ナトリウム（ビタミンC）の細胞障害活性を強く促進することを見出した（*Anticancer Res.*, 16: 2981-2986, 1996）。このことは、リグニンが、他の生理活性物質との併用により、相乗的に細胞障害活性、抗菌活性、抗ウイルス活性等を増強させる可能性があることを示唆している。ところが、従来、他の細胞障害活性物質等との併用効果という観点でのリグニンの有用性に焦点を当てた研究は殆ど皆無であった。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】従って、本発明の目的は、リグニンとの併用により、単独で 사용되는場合よりもその細胞障害活性又は抗微生物活性が増強される、好ましくは相乗的に増強される細胞障害活性物質又は抗微生物活性物質を見出し、当該活性増強効果に基づいて、より低用量でより強力な活性を示す新規な抗癌剤又は抗微生物剤を提供することである。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記の目的を達成すべく、マツ科植物の球果（松かさ）又は種子殻（松の実の殻）のアルカリ抽出液から単離されたリグニン成分（以下、「リグニンF」という場合もある）が、腫瘍細胞に対する種々の天然物（ビタミン、抗酸化物質、ポリフェノール、茶抽出液等）の細胞障害活性を促進するかどうかを調べた。その結果、本発明者らは、リグニンFが、ビタミンK₂、ビタミンK₃、エビガロカテキンガラート（以下、EGCGともいう）、クロロゲン酸（以下、CGAともいう）及び没食子酸（以下、GAともいう）の腫瘍細胞に対する細胞障害活性を増強することを見出した。特に、リグニンFは、ビタミンK₃及びクロロゲン酸の腫瘍細胞障害活性を相乗的に増強した。また、本発明者らは、リグニンFが、茶葉の水抽出物の腫瘍細胞、特に口腔上皮癌細胞に対する細胞障害活性を増強することを見出した。さらに、本発明者らは、リグニンFと抗微生物活性物質との併用効果についても検討した結果、リグニンFがEGCGの抗微生物活性を相乗的に増強することを見出した。

【0007】以上の知見に基づいて、本発明者らは、リグニンFとビタミンK₂、ビタミンK₃、EGCG、CGA又はGA、あるいはリグニンFと茶葉の水抽出物とを有効成分とする新規抗癌剤、リグニンFとEGCGとを有効成分とする新規抗微生物剤、並びにリグニンFとビタミンK₂、ビタミンK₃、EGCG、CGA又はGA、あるいはリグニンFと茶葉の水抽出物とを成分として含

有する新規健康食品の開発に成功して本発明を完成するに至った。

【0008】すなわち、本発明は、リグニンF、及びビタミンK₂、ビタミンK₃、EGCG、CGA又はGAのいずれかを有効成分とする抗癌剤を提供する。特に、ビタミンK₃とCGAにおいてリグニンFの併用による抗腫瘍活性の増強効果が顕著である。

【0009】また、本発明は、リグニンF及び茶葉の水抽出物を有効成分とする抗癌剤を提供する。リグニンFは、特に口腔上皮癌細胞に対する茶葉の水抽出物の細胞障害活性を増強する。

【0010】また、リグニンFはEGCGの抗微生物活性を相乗的に増強することから、別の本発明は、リグニンF及びEGCGを有効成分とする抗微生物用医薬組成物、又は抗微生物もしくは微生物除去剤を提供する。さらに、本発明は、有効量のリグニンF及びEGCGを非ヒト動物に投与することを特徴とする当該動物の微生物除去方法又は微生物感染症の予防及び治療方法、並びに微生物に汚染された又は汚染されるおそれのある物体に有効量のリグニンF及びEGCGを接触させることを特徴とする当該物体の微生物除去方法又は微生物汚染防止方法を提供する。

【0011】松かさや松の実の殻の抽出物は、例えば北九州地方などで癌の民間療法において古くから服用されている。一方、ビタミンK₂、ビタミンK₃、EGCG、CGA、GA及び茶葉の水抽出物は、いずれも食用もしくは薬用植物中に含まれる天然成分であるから、これらとリグニンFとの混合物は安全に食用として摂取することができる。従って、別の本発明は、リグニンFと、ビタミンK₂、ビタミンK₃、EGCG、CGA、GA又は茶葉の水抽出物のいずれかとを成分として含有する健康食品を提供する。このような健康食品は発癌予防効果を有し、特にリグニンFとEGCGとを含む食品はさらに顕著な抗微生物作用をも示すので、虫歯及び歯周病等の予防、あるいは他の微生物感染症の予防に有効である。

【0012】

【発明の実施の形態】「リグニンF」とは、マツ科植物の球果又は種子殻のアルカリ抽出物に含まれる、フェニルプロパン単位がランダムに重合したポリフェノールに糖が結合した成分をいう。マツ科植物は、マツ属、カラマツ属、トウヒ属等の10属からなり、現在約250種の植物がこれに分類されているが、本発明のリグニンFは、上記の構造的特徴を満たし、且つ単独で腫瘍細胞に対する細胞障害活性及び／又は抗微生物活性を有するとともに、ビタミンK₂、ビタミンK₃、EGCG、CGA又はGAとの共存下でこれらの物質の細胞障害活性及び／又は抗微生物活性を増強し得るものである限り、いずれのマツ科植物から単離されるものであってもよい。好ましくは、本発明のリグニンFは、マツ属（*Pinus*）に属する植物、例えば、五葉松、日本産のクロマツやア

(4) 開2003-40792 (P2003-40792A)

カマツ、ブラジル産松（エリオッティー、カリバエ、タエダ松等）、欧州産アカマツなどの球果又は種子殻から単離される。特に、種子（松の実）が食用となっている五葉松から単離されるリグニンFが、本発明において好ましく使用される。

【0013】リグニンFの抽出・単離方法としては、例えば以下の方法が挙げられる。球果（松かさ）を出発材料とする場合、直接アルカリ溶液で抽出してもよいが、まずメタノール、エタノール等のアルコールで予め油分を除去した後、（所望により、さらに熱水抽出等を行って不純物を分離除去してもよい）残渣についてアルカリ抽出を行うことがより好ましい。種子殻（松の実の殻）を出発材料とする場合も同様の前処理を行うことができるが、球果に比べて油分等の不純物が少ないので直接アルカリ抽出を行うこともまた好ましい。球果、種子殻とも必要に応じて適当に乾燥させ、抽出を容易にするため適当な粒度に粉碎して用いることができる。抽出溶媒のアルカリ溶液としては、無機塩基、有機塩基のいずれも使用することができ、例えば水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、アンモニア等の水溶液が使用できる。アルカリ溶液のpHは特に制限はないが、例えば、約9～13のものを使用することができる。使用するアルカリ溶液の量は、球果又は種子殻に対して約5～約20倍量である。抽出温度及び抽出時間も特に制限はないが、例えば、約15～約90℃で約30分間～約6時間抽出することができる。抽出完了後、逕過又は遠心分離等により上清を回収することにより、リグニンF含有画分を得ることができる。

【0014】上記の方法は単なる例示であって、アルカリ溶液での抽出操作を含む限り他のいかなる方法も使用することができ、当業者は、必要に応じて容易にそのような変更を行うことができる。

【0015】本発明のリグニンFは、上記の方法などにより得られたアルカリ抽出液を、さらに濃塩酸等による酸沈殿に付すことにより、さらに精製してから用いることもできる。

【0016】アルカリ抽出液は、必要に応じて、減圧濃縮等によって適当な濃度まで濃縮した後、酸で適当なpHに調整し、乾燥又は凍結乾燥により粉末として調製することもできる。

【0017】本発明の抗癌剤は、リグニンFに加えて、ビタミンK₂、ビタミンK₃、EGCG、CGA又はGAのいずれかを有効成分として含有する。これらの物質は、いずれも単独で腫瘍細胞に対する細胞障害活性を示す。

【0018】本発明において「ビタミンK₂」とは、メナキノン及びその誘導体並びに薬理学的許容されるそれらの塩であって、腫瘍細胞に対する細胞障害活性を有するものをいい、「ビタミンK₃」とは、メナジオン及びその誘導体並びに薬理学的許容されるそれらの塩であっ

て、腫瘍細胞に対する細胞障害活性を有するものをいうものとする。ビタミンK₂及びK₃は、いずれも従来公知の方法により調製することができる。

【0019】「エピガロカテキンガレート（EGCG）」は、緑茶に含まれる4種類のカテキンの1つであるが、本発明においては、腫瘍細胞に対する細胞障害活性を有する限り、その誘導体（例えば、脂肪酸とのエステル誘導体、アルキレンオキシドとのアルキルエーテル誘導体等）及び薬理学的許容されるそれらの塩（例えば、ナトリウム塩、カリウム塩、マグネシウム塩、カルシウム塩、亜鉛塩、バリウム塩、アルミニウム塩、アンモニウム塩等）をも含む包括的な意味で用いるものとする。EGCGは、例えば、茶葉を熱水や親水性有機溶媒で抽出して得られる抽出液からクロロホルム等によりカフェインを除去した後、さらに酢酸エチル等の有機溶媒で抽出してカテキン混合物を得、これをアセトン等の親水性有機溶媒を溶出剤とするカラムクロマトグラフィーに付して他のカテキンと分離することにより得ることができる。もちろん、市販のEGCGを使用することもできる。

【0020】「クロロゲン酸（CGA）」は、多くの双子葉植物の果実、葉（例えば、コーヒー豆、タバコ葉、ナシ葉、リンゴ果肉、サツマイモ、桑、茶等）に含まれるモノーまたはジカフェイルキニン酸の総称であるが、本発明においては、腫瘍細胞に対する細胞障害活性を有する限り、その誘導体（例えば、アルコールや脂肪酸とのエステル誘導体、アルキレンオキシドとのアルキルエーテル誘導体等）及び薬理学的許容されるそれらの塩（例えば、ナトリウム塩、カリウム塩、マグネシウム塩、カルシウム塩、亜鉛塩、バリウム塩、アルミニウム塩、アンモニウム塩、硫酸塩、リン酸塩等）をも含む包括的な意味で用いるものとする。CGAは、例えば、コーヒー豆粉砕物を、水又は熱水、アルコール、アセトン、クロロホルム等の親水性有機溶媒、あるいはそれらの混合溶媒で抽出し、陽イオン交換樹脂等を用いてカフェインを除去した後、カラムクロマトグラフィーに付すことにより精製することができる。もちろん、市販のCGAを使用することもできる。

【0021】「没食子酸（GA）」は、没食子（ブナ科のナラ属植物の若枝にハチが産卵する時の刺激で生じる虫瘤）、茶、五倍子（ウルシ科のヌルデの葉茎にフシムシが寄生した刺激で生じる虫瘤）等の植物の根、茎、葉、果実等に含まれる、タンニンの基本構成単位である。本発明においては、腫瘍細胞に対する細胞障害活性を有する限り、遊離酸だけでなく、その誘導体（例えば、アルコールや脂肪酸とのエステル誘導体、アルキレンオキシドとのアルキルエーテル誘導体等）及び薬理学的許容されるそれらの塩（例えば、ナトリウム塩、カリウム塩、マグネシウム塩、カルシウム塩、亜鉛塩、バリウム塩、アルミニウム塩、アンモニウム塩、硫酸塩、リ

(5) 開2003-40792 (P2003-40792A)

ン酸塩等)をも含む包括的な意味で用いるものとする。GAは上記の植物材料から周知の方法により抽出精製することができる。また、GAは、タンニンの加水分解、シキミ酸の脱水素、フェニルプロパノイドの β 酸化等によっても得ることができる。

【0022】本発明の抗癌剤の有効成分(補助有効成分)であるリグニンFは、もう一方の有効成分(主有効成分)であるビタミンK₂、ビタミンK₃、EGCG、CGA又はGAの腫瘍細胞に対する細胞障害活性を増強する作用を示す。本発明の製剤により治療できる癌はヒトをはじめとする哺乳動物に生じる癌であれば特に限定されず、例えば、口腔、胃、大腸、肺、乳房、肝臓、食道、子宮、骨髄、筋肉、血液等の癌が挙げられる。

【0023】主有効成分とリグニンFは、必要に応じて医薬上許容される担体(例えば、賦形剤、希釈剤等)などの必要な成分と適宜混合し、液状製剤、粉末、顆粒、錠剤、カプセル剤、シロップ剤、注射剤、エアロゾル剤等の剤形で製剤化することができ、経口的または非経口的に投与することができる。

【0024】医薬上許容される担体としては、例えば、ショ糖、デンプン、マンニト、ソルビット、乳糖、グルコース、セルロース、タルク、リン酸カルシウム、炭酸カルシウム等の賦形剤、セルロース、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリプロピルピロリドン、ゼラチン、アラビアゴム、ポリエチレングリコール、ショ糖、デンプン等の結合剤、デンプン、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルスターチ、ナトリウムグリコールスターチ、炭酸水素ナトリウム、リン酸カルシウム、クエン酸カルシウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、エアロジル、タルク、ラウリル硫酸ナトリウム等の滑剤、クエン酸、メントール、グリシリジン・アンモニウム塩、グリシン、オレンジ粉等の芳香剤、安息香酸ナトリウム、亜硫酸水素ナトリウム、メチルパラベン、プロピルパラベン等の保存剤、クエン酸、クエン酸ナトリウム、酢酸等の安定剤、メチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ステアリン酸アルミニウム等の懸濁剤、界面活性剤等の分散剤、水、生理食塩水、オレンジジュース等の希釈剤、カカオ脂、ポリエチレングリコール、白灯油等のベースワックスなどが挙げられるが、それらに限定されるものではない。

【0025】好ましくは、本発明の製剤は経口用または注射用製剤である。経口投与に好適な製剤は、水、生理食塩水、オレンジジュースのような希釈液に、有効量(単独で腫瘍細胞に対する細胞障害活性を発揮するのに十分な量)の主有効成分と、有効量(主有効成分の腫瘍細胞に対する細胞障害活性を増強させるのに十分な量)のリグニンFを溶解させた液剤、有効量の両物質を固体や顆粒として含んでいるカプセル剤、サッシェ剤または錠剤、適当な分散媒中に有効量の両物質を懸濁させた懸

濁液剤、有効量の両物質を溶解させた溶液を適当な分散媒中に分散させ乳化させた乳剤等である。

【0026】非経口的な投与に好適な製剤としては、水性および非水性の等張な無菌の注射液剤があり、これには抗酸化剤、緩衝液、制菌剤、等張化剤等が含まれていてもよい。また、水性および非水性の無菌の懸濁液剤が挙げられ、これには懸濁剤、可溶化剤、肥厚剤、安定化剤、防腐剤等が含まれていてもよい。本発明の製剤は、アンブルやバイアルのように単位投与量あるいは複数回投与量ずつ容器に封入することができる。また、有効量の主有効成分及び有効量のリグニンF並びに医薬上許容される担体を凍結乾燥(フリーズドライ)し、使用直前に適当な無菌のビヒクルに溶解または懸濁すればよい状態で保存することもできる。

【0027】本発明の抗癌剤の投与量は、主有効成分であるビタミンK₂、ビタミンK₃、EGCG、CGA又はGA、及び補助有効成分であるリグニンFの各有効量、両物質の細胞毒性、癌の種類、病気の進行度、投与対象の薬物受容性、体重、年齢等によって異なるが、例えば、経口投与の場合、リグニンFの量として、約1〜約200mg/kg体重、主有効成分の量として、約0.1〜約10mg/kg体重(ビタミンK₂)、約0.01〜約1mg/kg体重(ビタミンK₃)、約0.1〜約20mg/kg体重(EGCG)、約0.1〜約20mg/kg体重(CGA)、又は約0.1〜約20mg/kg体重(GA)である。これらの量を1日1回または数回に分けて投与することができる。

【0028】本発明の抗癌剤の特に好ましい態様は、主有効成分としてビタミンK₃又はCGAを含有するものである。これらの物質は、リグニンFの作用によりその腫瘍細胞に対する細胞障害活性が相乗的に増強される。

【0029】上記の主有効成分に対して抗腫瘍活性の増強作用を示す一方で、リグニンFは、他の抗腫瘍活性物質に対しては活性増強作用を示さないか、あるいは反対に活性阻害作用を示す場合すらある。例えば、クルクミン(ショウガ科のウコン根茎に含まれる黄色色素)やドバミン(中枢性の神経伝達物質として作用するカテコールアミン)の細胞障害活性は、リグニンFにより顕著に抑制される。従って、リグニンFは、クルクミンやドバミンの投与による副作用の緩和やドバミンの過剰分泌に伴う症状の緩和に有効であるかもしれない。

【0030】本発明の別の抗癌剤は、リグニンFと茶葉の水抽出物とを有効成分とする。リグニンFについては、上記と同様のものが好ましく使用される。「茶葉」はチャノキ属(Thea)に属する植物の葉(茎を含む)を飲用に加工したものであれば特に制限はなく、いわゆる緑茶や、紅茶、ウーロン茶等の葉が挙げられる。好ましくは、ウーロン茶等の半発酵茶、紅茶等の発酵茶が挙げられる。また、茶葉を成分として含む限り、香料等の他の成分を含む加工茶もこれに包含される。

(6) 開2003-40792 (P2003-40792A)

【0031】抽出溶媒の「水」は、水道水、蒸留水、脱イオン水、ミネラルウォーター等のいずれであってもよい。使用する水の量は、茶葉に対して約2〜約10倍量である。抽出温度及び抽出時間も特に制限はないが、例えば、約15〜約90℃で約30分間〜約6時間抽出することができる。抽出完了後、滲過及び／又は遠心分離等を行って上清を回収することにより、茶葉の水抽出液を得ることができる。該抽出液は、必要に応じて、減圧濃縮等によって適当な濃度まで濃縮した後、乾燥又は凍結乾燥により粉末として調製することもできる。

【0032】リグニンF及び茶葉の水抽出物は、必要に応じて医薬上許容される担体（例えば、賦形剤、希釈剤等）などの成分と適宜混合し、液状製剤、粉末、顆粒、錠剤、カプセル剤、シロップ剤、注射剤、エアロゾル剤等の剤形で製剤化することができ、経口的または非経口的に投与することができる。医薬上許容される担体としては、本発明の別の抗癌剤について上記したものが同様に使用され得る。また、投与形態、投与経路についても上記と同様のものが使用可能である。

【0033】リグニンFと茶葉の水抽出物とを有効成分とする抗癌剤により治療される癌は、ヒトをはじめとする哺乳動物に生じる癌であれば特に限定されず、例えば、口腔、胃、大腸、肺、乳房、肝臓、食道、子宮、骨髄、筋肉、血液等の癌が挙げられるが、好ましくは口腔癌、特に口腔上皮細胞癌である。

【0034】リグニンFとEGCGは、それぞれ単独で動物の種々の組織において微生物感染に対して抗微生物作用を発揮することが知られているが（ここで「微生物」とは、細菌、放線菌等の原核生物、酵母、糸状菌等の真菌類、ウイルス等を包含するものである）、リグニンFは、EGCGの当該抗微生物活性を相乗的に増強する作用を示す。従って、本発明はまた、EGCGを主有効成分とし、リグニンFを補助有効成分とする抗微生物用医薬組成物を提供する。

【0035】好ましくは、本発明の抗微生物用医薬組成物は、虫歯や歯周病の原因菌である口腔細菌や、病原性大腸菌等の腸内細菌、カンジダ酵母や白癬菌等の皮膚病原菌、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、B型肝炎ウイルス（HBV）、C型肝炎ウイルス（HCV）、パルボウイルス、ボックスウイルス等の病原ウイルスに対して、顕著な抗微生物活性及び微生物除去活性を有する。

【0036】本発明の抗微生物用医薬組成物において、リグニンFとEGCGとは、必要に応じて医薬上許容される担体（例えば、賦形剤、希釈剤等）などの成分と適宜混合し、液状製剤、粉末、顆粒、錠剤、カプセル剤、シロップ剤、注射剤、エアロゾル剤等の剤形で製剤化することができ、経口的または非経口的に投与することができる。医薬上許容される担体としては、上記抗癌剤について例示されたものが同様に使用され得る。また、投与形態、投与経路についても上記抗癌剤と同様のものが

使用可能である。

【0037】本発明の抗微生物用医薬組成物の投与量は、主有効成分であるEGCG及び補助有効成分であるリグニンFの各有効量、細胞毒性、病原菌の種類、病気の進行度、投与対象の薬物受容性、体重、年齢等によって異なるが、例えば経口投与の場合、通常、リグニンFの量として約0.2〜約2mg/kg体重、EGCGの量として、約0.02〜約0.2mg/kg体重であり、これらの量を1日1回または数回に分けて投与することができる。

【0038】本発明の抗微生物用医薬組成物の投与対象はヒトに限定されず、当該製剤は、病原性微生物に感染した、あるいは感染するおそれのある他の哺乳動物及び鳥類にも有効に投与され得る。特に、ヒトの病原性微生物感染の重要な感染経路の1つとして、ウシ、ブタ等の家畜類、ニワトリ、アヒル等の家禽類の汚染が挙げられることから、本発明の抗微生物用医薬組成物は、ヒトにとっての病原性微生物を保有する家畜及び家禽類からの当該微生物の除去、あるいは家畜及び家禽類の当該微生物への感染予防に好ましく使用することができる。従って、本発明はまた、有効量（抗微生物活性又は微生物除去活性を発揮するのに十分な量）のEGCG及び有効量（EGCGの抗微生物活性又は微生物除去活性を増強させるのに十分な量）のリグニンFを非ヒト動物に投与することを特徴とする、当該動物からの有害微生物の除去方法又は微生物感染症の予防及び治療方法を提供する。

【0039】本発明の非ヒト動物用抗微生物用医薬組成物は、従来広く使用されている家畜又は家禽用飼料と配合して使用することができる。従って、本発明はまた、有効量のリグニンF及び有効量のEGCGを配合してなる家畜又は家禽用飼料を提供する。

【0040】リグニンFとEGCGの併用は、ヒト等の動物における微生物感染の予防及び治療等のインビボでの効果だけでなく、広く人間環境の微生物汚染の防御及び除去にも有用である。従って、本発明はまた、微生物に汚染された物体に有効量のリグニンF及び有効量のEGCGを接触させることを特徴とする当該物体からの微生物の除去方法、あるいは微生物に汚染されるおそれのある物体に予め有効量のリグニンF及び有効量のEGCGを接触させることを特徴とする当該物体の微生物汚染防止方法、並びに当該方法に使用される、リグニンF及びEGCGを有効成分とする抗微生物もしくは微生物除去剤（以下、抗微生物／微生物除去剤ともいう）を提供する。

【0041】本発明において「抗微生物もしくは微生物除去剤（抗微生物／微生物除去剤）」とは、清掃用等の医薬用途以外における使用のための組成物をいうものとする。従って、本発明の抗微生物／微生物除去剤は、リグニンFとEGCGの各有効量を、当該分野で通常使用される担体（例えば、賦形剤、希釈剤等）などの成分と

(7) 開2003-40792 (P2003-40792A)

適宜混合し、液剤、粉末、顆粒、錠剤、噴霧剤等の適切な形態にデザインすることができるが、ここで用いられる担体等は医薬上許容されるものに限定されない。ここで「EGCGの有効量」とは、少なくとも、本剤が適用される物体上に存在する微生物の増殖を実質的に抑制するのに十分な量をいう。ここで「実質的に抑制する」とは、本剤が適用される物体上の微生物量が、当該物体を所定の目的に安全に使用できる程度に微生物の増殖を抑制することをいう。また、「リグニンFの有効量」とは、少なくとも、本剤が適用される物体上に存在する微生物の増殖を実質的に抑制するのに十分な程度に、EGCGの抗微生物/微生物除去活性を増強させるのに十分な量をいう。具体的には、本発明の抗微生物/微生物除去剤中のEGCGの濃度は約0.01～約10mg/mL、リグニンFの濃度は約0.1～約100mg/mLである。

【0042】本発明の抗微生物/微生物除去剤は、EGCG及びリグニンFの抗微生物/微生物除去作用に不利な影響を及ぼさない限り、使用目的に応じて他の殺菌剤、界面活性剤、漂白剤、芳香剤等を適宜配合させることができる。

【0043】本発明の抗微生物/微生物除去剤が適用される物体は、微生物、特に病原性微生物に汚染されるか、あるいは汚染されるおそれのある物体であれば制限はなく、例えば、食器その他の台所用品、流し台、衣類、リネン類、トイレ、洗面台、浴室等が挙げられる。あるいは、本発明の抗微生物/微生物除去剤はフィルムやシート等の素材に浸透させることにより、抗微生物フィルムもしくはシート等としての応用が可能である。

【0044】リグニンFは、従来より食用として安全に摂取されている五葉松の松の実の殻や、癌の民間療法として服用されてきた松かさ抽出物由来の成分であり、投与量に比べてLD₅₀値が高く、安全域の広い物質である。一方、ビタミンK₂、ビタミンK₃、EGCG、CGA又はGA、あるいは茶葉の水抽出物は、いずれも食用植物もしくは薬用植物由来の成分であり、同様に安全域の広い物質である。従って、リグニンFとビタミンK₂、ビタミンK₃、EGCG、CGA又はGA、あるいは茶葉の水抽出物との混合物は、上記のような医薬もしくは医薬部外品としてだけではなく、単独で、又は許容される食品添加物とともに、健康食品等の食品としても利用することができる。即ち、本発明はまた、リグニンFと、ビタミンK₂、ビタミンK₃、EGCG、CGA又はGA、あるいは茶葉の水抽出物とを成分として含有する食品を提供する。許容される食品添加物としては、通常使用される防腐剤、着色料、香料、安定剤等が挙げられる。また、糖分、蛋白質、脂質、アミノ酸、ビタミン類、鉄分、カルシウム、マグネシウム、食物繊維等の他の栄養素等と混合して多機能性栄養食品とすることもできる。

【0045】本発明の食品は、発癌予防、虫歯及び歯周病予防、各種病原微生物による感染症の予防等の効果を発揮するのに十分な量のビタミンK₂、ビタミンK₃、EGCG、CGA又はGA、あるいは茶葉の水抽出物と、これらの物質の生理活性を増強するのに十分な量のリグニンFとを含有する限り、いかなる形態の食品であってもよい。しかしながら、上述のように、リグニンFとEGCGとは虫歯及び歯周病菌等の口腔細菌に対して強力な抗菌作用を示すので、本発明の食品の好ましい一実施態様としてチューイングガムが例示される。本発明のチューイングガムの製造には当該分野で周知のいずれの方法も使用することができる。例えば、以下の方法：(1) 約70～120℃の加熱温度でガムベースを可塑剤または軟化剤あるいはこの両者と練り合わせて、所定の硬さと粘度成形性を有する均質な混練物を形成させ、(2) その後これを混練しながら、リグニンF及びEGCG、及び必要に応じて甘味料、芳香剤、着色料、他の機能性素材（例えば、アミノ酸、ビタミン類、鉄分、カルシウム、マグネシウム、食物繊維等）などのうちから選ばれた所定の添加剤が吸着されている顆粒状物質を加え、(3) さらに混練しながら甘味料または着色料などの所定の添加剤を加え、(4) 得られた混練物をミキサーから取り出して成形する、を使用することができるが、これに限定されない。

【0046】本発明のチューイングガムに含有されるリグニンF及びEGCGは、全体として虫歯及び歯周病の予防効果を示すのに十分なそれぞれの量であれば特に限定されないが、例えば、1g中にリグニンFが約0.2～50mg、EGCGが約0.02～約5mgである。

【0047】

【実施例】以下に実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明するが、これらは単なる例示であって本発明の範囲を何ら限定するものではない。尚、以下の化合物は、それぞれ記載された会社から購入した。ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) (BRL社、Gland Island, NY)；胎児牛血清 (FBS) (JRH Biosci社、Lenexa, KS)；GA (東京化成工業株式会社、東京)；EGCG、CGA (3-caffeoylquinic acid hemihydrate)、ジメチルスルホキシド (DMSO)、クルクミン (以上、和光純薬株式会社、大阪)；3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)、ドバミン (シグマ社、St. Louis, MO)；ビタミンK₂とK₃は、エーザイ株式会社より供与された。

【0048】実施例1 リグニンFの調製

中国産五葉松 (*Pinus parviflora* Sieb. et Zucc.) の球果250gをよく洗浄して汚れを落とした後、メタノール、次いで85%エタノールで2回ずつ洗浄して油分を除去した。次に、沸騰水で4時間、3回抽出を行った。残渣に1%水酸化ナトリウム水溶液を加え、室温で4時間抽出した。該抽出液を10,000×gで20分

(8) 開2003-40792 (P2003-40792A)

間違心して残渣を除いた後、上清に酢酸を加えてpHを5.0に調整し沈殿物画分を得た。この画分を十分量の水に対して透析し、凍結乾燥することによりリグニンFの粉末を得た (Anticancer Res., 7: 1153-1160, 1987)。

【0049】実施例2 茶葉の水抽出物の調製
日本茶 (静岡県産)、中国緑茶 (山東省産)、中国ジャスミン茶 (山東省産)、ウーロン茶 (台湾産) 及び紅茶 (Hedians, パリ) の各種茶葉、並びに麦茶 (常陸屋本舗、東京) に4倍量の脱イオン水を加えて、80℃で2時間抽出した。メッシュで濾過した後、濾液を遠心 (8000 rpm, 10分) し、その上清を凍結乾燥して茶葉 (又は麦茶) の水抽出物を得た。抽出物の収率は、それぞれ、7.8、51.8、19.2、19.4、17.2、20.5%であった。

【0050】試験例1 各種細胞障害活性物質の腫瘍細胞

胞に対する細胞障害活性に及ぼすリグニンFの併用効果
試験細胞株として、ヒト口腔扁平上皮癌細胞株 (HSC-2)、ヒト唾液腺腫瘍細胞株 (HSG)、及びコントロールとしてヒト歯肉線維芽細胞 (HGF) を、10%非働化FBSを含むDMEM培養液中、5% CO₂、95%湿度の環境下で37℃にて培養し、継代培養7～9回目の細胞を試験に用いた (Phytomedicine, 7(6): 483-491, 2000)。対数増殖期の細胞を、種々の濃度の被験物質 (ビタミンK₂、ビタミンK₃、EGCG、CGA、GA、クルクミン又はドパミン) 及びリグニンFとともに24時間インキュベートし、相対的な生細胞数 (540 nmでの吸光度) をMTT法により測定した (Phytomedicine, 7(6): 483-491, 2000)。その結果を図1及び表1に示す。

【0051】

【表1】

被験物質	細胞障害活性に及ぼすリグニンFの効果	
	HSG	HSC-2
ビタミンK ₂	相加的	相加的
ビタミンK ₃	相乗的	相乗的
EGCG	相加的	相加的
CGA	相乗的	相加的
GA	相加的	相加的
クルクミン	相互干渉	相互干渉
ドパミン	相互干渉	相互干渉

【0052】リグニンFは、単独でヒト口腔癌細胞HSC-2及びHSGの増殖を僅かに抑制したが、ヒト歯肉線維芽細胞HGFの増殖を抑制しなかった (図1)。即ち、リグニンFは腫瘍選択的な細胞障害活性を示すことがわかる。リグニンFは、HSG細胞に対するビタミンK₃とCGAの細胞障害活性を相乗的に促進し、ビタミンK₂、EGCG及びGAの細胞障害活性を相加的に促進した (表1)。対照的に、リグニンFは、濃度依存的にクルクミンとドパミンの細胞障害活性を減少させた (表1)。ドパミンの細胞障害活性に対するリグニンFの保護効果は特に顕著であった。

【0053】試験例2 各種細胞障害活性物質のラジカル強度に及ぼすリグニンFの併用効果
各種被験物質 (ビタミンK₃、EGCG、CGA又はGA) をリグニンFと0.1M NaHCO₃/Na₂CO₃緩衝液 (pH 9.0又は9.5) 中で混合し、ラジカル強度を電子スピン共鳴 (ESR) スペクトル測定装置 (JEOL JES RE1X, X-band, 100 kHz modulation frequency) により測定した (Anticancer Res., 17: 3479-3483, 1997; Anticancer Res., 20: 2473-2476, 2000)。装置の各条件は以下の通りであった: center field, 336±5.0 mT; microwave power, 8 mW; modulation amplitude, 0.1 mT; gain, 400-63

0, time constant, 0.03 s, scanning time, 2 min。その結果を図2に示す。

【0054】リグニンFは、アルカリ条件下でブロードなラジカルを生成すること、リグニンFと、ビタミンK₃、EGCGあるいはGAとの併用は、ラジカル強度を有意に増強させることが判明した (図2)。これは、リグニンFによる細胞障害活性の増強作用と一致する。しかし、リグニンFの添加は、CGAのラジカル強度を増強せず、CGAの多数のラジカルピークを、リグニン様のESRシグナルパターンへと変換させた (図2)。麦茶抽出物 (negative control) はリグニンのラジカル強度には何ら影響を与えなかったが (図2)、これは、麦茶がリグニンの細胞障害活性に影響を与えないことと一致する (後記試験例3; 表2)。

【0055】試験例3 各種茶葉の水抽出物の腫瘍細胞に対する細胞障害活性に及ぼすリグニンFの併用効果
試験例1において細胞障害活性物質として実施例2にて調製した各種茶葉の水抽出物を用い、同様に腫瘍細胞に対する細胞障害活性に及ぼすリグニンFの併用効果をMTT法により調べた。その結果を表2に示す。

【0056】

【表2】

(9) 開2003-40792 (P2003-40792A)

被験物質	細胞障害活性に及ぼすリグニンFの効果	
	HSG	HSC-2
日本製緑茶	無効	相加的
日本製交茶	無効	無効
紅茶	相加的	相加的
中国製緑茶	無効	相加的
中国製ジャスミン茶	無効	相加的
中国製ウーロン茶	無効	相加的

【0057】リグニンFは、HSC-2細胞に対する各種茶葉抽出物の細胞障害活性を相加的に促進した(表2)。麦茶の水抽出物は、単独では細胞障害活性を示さなかった。

【0058】試験例4 EGCGの抗菌活性に及ぼすリグニンFの併用効果

大腸菌 (*Escherichia coli* sp.) を、brain heart infusion agar (BHI, Difco laboratories, Detroit, MI) 中、37℃にて好氣的条件下で生育させた。抗菌活性は寒天平板希釈法により測定した。その結果を表3に示す。

【0059】

【表3】

被験物質	コロニー数 (対照に対する%)	
対照 (水control)	176±6	(100)
EGCG (0.03 mg/mL)	52±16	(30)
EGCG (0.1 mg/mL)	3±2	(2)
対照 (DMSO control)	224±56	(100)
リグニンF (0.0525 mg/mL)	136±72	(62)
リグニンF (0.125 mg/mL)	115±84	(51)
リグニンF (0.25 mg/mL)	113±77	(50)
リグニンF (0.5 mg/mL)	123±57	(55)
リグニンF (1 mg/mL)	81±30	(36)
EGCG (0.03 mg/mL) トリグニンF (0.0525 mg/mL)	50±13	(22)
EGCG (0.03 mg/mL) トリグニンF (0.125 mg/mL)	46±14	(21)
EGCG (0.03 mg/mL) トリグニンF (0.25 mg/mL)	23±10	(10)
EGCG (0.03 mg/mL) トリグニンF (0.5 mg/mL)	25±4	(11)
EGCG (0.03 mg/mL) トリグニンF (1 mg/mL)	9±3	(4)

各々の値は、6個の実験値の平均値±S.D.を表わす。

【0060】EGCGは、単独で濃度依存的に大腸菌のコロニー数を減少させた(表3)。リグニンFも単独で抗菌活性を示したが、その効果はEGCGに比べて低かった。EGCGとリグニンFとを併用すると、EGCGの殺菌活性が更に増強された(表3)。

【0061】

【発明の効果】本発明のリグニンFは、ビタミンK₂、ビタミンK₃、EGCG、CGA又はGA、あるいは茶葉の水抽出物との併用により、これらの物質の腫瘍選択的細胞障害活性を増強するので、癌化学療法において新たなアプローチを提供する。また、本発明のリグニンFは、EGCGの抗微生物及び微生物除去活性を相乗的に増強するので、これらを併用することは、ヒトを含む動物の微生物感染の予防及び治療、家畜及び家禽類からの有害微生物の除去、食器や台所用品等の微生物汚染防止に有用である。さらに、本発明のリグニンF及びビタミンK₂、ビタミンK₃、EGCG、CGA又はGA、あるいは茶葉の水抽出物は、従来より安全に食用として摂取されている植物由来の成分であるので、医薬品としてだけでなく、健康食品等の原料としても極めて有用であ

る。

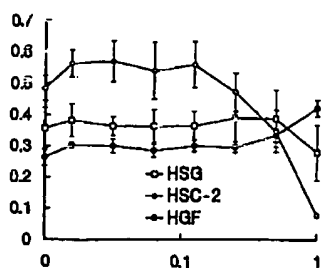
【図面の簡単な説明】

【図1】種々の濃度のリグニンFとともに24時間培養したヒト口腔扁平上皮癌細胞株(HSC-2)、ヒト唾液腺腫瘍細胞株(HSG)及びヒト歯肉線維芽細胞(HGF)における相対的な生細胞数を示すグラフである。横軸はリグニンF濃度(mg/mL)、縦軸は540 nmでの吸光度を示す。各値は、4つの実験値の平均値±S.D.である。

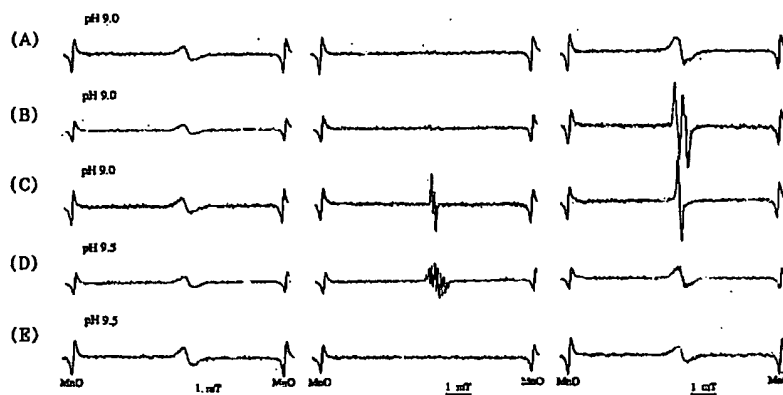
【図2】各種細胞障害活性物質のラジカル強度に及ぼすリグニンFの併用効果を示すESRスペクトル分析のチャート図である。(A)左から、リグニンF (1 mg/mL) (pH 9.0)、ビタミンK₃ (4 mM)、リグニンF+ビタミンK₃; (B)左から、リグニンF (1 mg/mL) (pH 9.0)、EGCG (5 mM)、リグニンF+EGCG; (C)左から、リグニンF (1 mg/mL) (pH 9.0)、GA (4 mM)、リグニンF+GA; (D)左から、リグニンF (1 mg/mL) (pH 9.5)、CGA (0.4 mM)、リグニンF+CGA; (E)左から、リグニンF (1 mg/mL) (pH 9.5)、麦茶抽出物 (1 mg/mL)、リグニンF+麦茶抽出物

(10) 2003-40792 (P2003-40792A)

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁷

識別記号

F I

(参考)

A 6 1 K 31/353

A 6 1 K 31/353

A 6 1 P 31/04

A 6 1 P 31/04

35/00

35/00

(72) 発明者 姜 宜

F ターム(参考) 4B018 MD23 MD48 MD59 MD60 ME08

アメリカ合衆国、ワシントン州 98195-

4C086 AA01 AA02 BA08 MA03 MA04

7720、シアトル、(番地なし) ユニヴァ

MA52 NA14 ZB26 ZB32

ーシティ オヴ ワシントン、デパートメ

4C088 AB03 AB45 AC04 AC05 BA08

ント オヴ メディシン、ザ マーキ

BA09 CA03 CA05 MA03 MA07

モレキュラー センター アンド ザ デ

MA52 NA14 ZB26 ZB32

イヴィジョン オヴ ヘマトロジー、シー

4C206 AA01 AA02 CB28 DB20 DB56

/オー ドクター ベイロン ワン

MA03 MA04 MA72 NA14 ZB26

ZB32

BEST AVAILABLE COPY